

No title available.

Patent Number: EP0699767, A4, B1

Publication date: 1996-03-06

Inventor(s): MIYAUCHI KAZUHITO (JP); SUGIUCHI HIROYUKI (JP); MIIKE AKIRA (JP); OHSAWA SUSUMU (JP); SHUTOH EIKO (JP); UEKAMA KANETO (JP); IRIE TETSUJI (JP)

Applicant(s):: KYOWA MEDEX CO LTD (JP)

Requested Patent: JP8131197

Application Number: EP19950910768 19950308

Priority Number(s): WO1995JP00378 19950308; JP19940037328 19940308; JP19940217224 19940912; JP19940296137 19941130

IPC Classification: C12Q1/60 ; C12Q1/44 ; C12Q1/26 ; C12Q1/32

EC Classification: C12Q1/60

Equivalents: AU1861995, AU677514, CA2162289, DE69522159D, DE699767T, ES2106694T, GR98300003T, JP2600065B2, KR188576, US5691159, WO9524502

Abstract

A method of determining cholesterol in high-density lipoprotein (HDL) by treating a HDL-containing specimen with a cholesterol ester hydrolase and a cholesterol oxidase or a cholesterol dehydrogenase in the presence of a reagent capable of aggregating lipoproteins other than HDL, and determining the formed hydrogen peroxide or reduced coenzyme.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11)特許番号

第2600065号

(45)発行日 平成9年(1997)4月16日

(24)登録日 平成9年(1997)1月29日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q	1/60	7823-4B	C 1 2 Q	1/60
	1/26	7823-4B		1/26
	1/32	7823-4B		1/32
	1/44	7823-4B		1/44

請求項の数3(全7頁)

(21)出願番号	特願平6-296137	(73)特許権者	000162478 協和メデックス株式会社 東京都中央区入船二丁目1番1号
(22)出願日	平成6年(1994)11月30日	(72)発明者	宮内 一人 静岡県田方郡函南町仁田816-4
(65)公開番号	特開平8-131197	(72)発明者	三池 彰 静岡県駿東郡長泉町納米里410-1
(43)公開日	平成8年(1996)5月28日	(72)発明者	首藤 栄子 大分県大分市花園17組の3
(31)優先権主張番号	特願平6-37328	(72)発明者	杉内 博幸 熊本県熊本市長嶺町1675-31
(32)優先日	平6(1994)3月8日	(72)発明者	入江 敏美 熊本県熊本市健軍町2484-17
(33)優先権主張国	日本(J P)	(74)代理人	弁理士 佐伯 審生
(31)優先権主張番号	特願平6-217224	審査官	伊藤 明
(32)優先日	平6(1994)9月12日		
(33)優先権主張国	日本(J P)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】高密度リポ蛋白中のコレステロールの定量法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】高密度リポ蛋白(HDL)以外のリポ蛋白を凝集させる試薬を含む緩衝液の存在下、HDLを含有する試料にコレステロールエステル加水分解酵素およびコレステロール酸化酵素またはコレステロール脱水素酵素を作用させて、生成した凝集物を分離することなく、緩衝液中に生成する過酸化水素または還元型補酵素を定量することを特徴とするHDL中のコレステロールの定量法。

【請求項2】HDL以外のリポ蛋白を凝集させる試薬がヘパリンまたはその塩、リソチングスチン酸またはその塩、デキストラン硫酸またはその塩、ポリエチレングリコール、硫酸化シクロデキストリンまたはその塩、硫酸化オリゴ糖またはその塩もしくはこれらの混合物、および2価の金属塩からなる請求項1記載のHDL中のコ

レステロールの定量法。

【請求項3】コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール酸化酵素またはコレステロール脱水素酵素が化学修飾されたコレステロールエステラーゼ、化学修飾されたコレステロールオキシダーゼまたは化学修飾されたコレステロールデヒドロゲナーゼである請求項1記載のHDL中のコレステロールの定量法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、臨床診断の分野において脂質代謝の面で重要な高密度リポ蛋白(HDL)中のコレステロール(以下、HDLコレステロールという)の定量法に関する。

【0002】

【従来の技術】HDLは、動脈壁を含めた各組織からコ

1

レステロールを受け取るため細胞内に蓄積したコレステロールの除去作用に関係し、冠動脈硬化症をはじめとする各種動脈硬化症の危険予防因子であり、その血中レベルは動脈硬化性疾患の発症予知に有用な指針となることが知られている。従来のHDLコレステロールの定量法は、大きく分けて分画操作とコレステロール定量操作の2段階からなる。分画操作法には、超遠心法、免疫化学的方法、電気泳動法、沈殿法などがある。超遠心法を用いる場合には、分離用超遠心器で比重の差によってHDLを分離し、そのコレステロール量を測定する。しかしながら、定量性、簡便性、経済性などの面で欠点がある。免疫化学的方法には、免疫電気泳動法、一元免疫拡散法(SRID法)、オクタロニー法などがあるが、これらの方法を用いる場合にはアボ蛋白を認識しており、正確にはリボ蛋白を認識していないという問題がある。電気泳動法を用いる場合には、セルロースアセテート膜やアガロースゲルなどを支持体として分離し、酵素法によりコレステロールを定量する。この方法は、簡便性、経済性などの面で問題がある。沈殿法を用いる場合には、低密度リボ蛋白(LDL)、超低密度リボ蛋白(VLDL)およびカイロミクロン(CM)の表面に存在するアボ蛋白Bにポリエチレンジコール、ヘパリン、リソチングステン酸、デキストラン硫酸などのポリアニオンと2価の陽イオンを結合させ、不溶性沈殿物を形成させ、これを遠心分離操作によって除去し、上清中のHDLコレステロールを定量する(臨床検査法提要、第29版、金井泉著、金原出版、471頁、1983年)。この方法は最も簡便であるが、遠心分離器による遠心分離操作を行うため、多数検体処理、迅速測定および臨床検査の分野で多く使用されている自動分析装置には不向きである。さらに、従来の分画法では、分離したHDL画分を定量ピベットではかり取る場合などに人为的誤差も生じ易い。以上のように、HDLコレステロール測定の煩雑さは、その分画操作にある。しかしながら、単純にHDLを分画せずに血清検体を直接コレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼが含有された試薬に添加しても、総コレステロールを定量する系と変わりがなく、HDLコレステロールを特異的に定量できない。特開昭63-126498には、コール酸類を添加してその特異性を高めることができると記載されているが、この方法では、HDLのみならずLDL、VLDLなども徐々に反応し完全な反応終点が得られにくくことにより、特異性が必ずしも充分でない。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、煩雑な分画分離操作の不要な簡便なHDLコレステロールの定量法を提供することにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、HDL以外のリボ蛋白すなわちLDL、VLDLおよびCMを凝

2

集させる試薬の存在下、コレステロール反応試薬を用いてコレステロール定量の酵素反応をさせることにより、特に生成した凝集物を分離することなくHDLを含有する試料中のHDLコレステロールを特異的に定量できることを見い出し、本発明に至った。

【0005】本発明は、HDL以外のリボ蛋白を凝集させる試薬の存在下、HDLを含有する試料にコレステロール加水分解酵素およびコレステロール酸化酵素またはコレステロール脱水素酵素を作用させ、生成する過酸化水素または還元型補酵素を定量することを特徴とするHDL中のコレステロールの定量法に関する。

【0006】本発明方法は、血液、尿などのHDLを含有する体液に適用できる。次に、本発明の定量法の一例について説明する。第一試薬として、HDL以外のリボ蛋白を凝集させる試薬を含む中性付近の緩衝液を調製する。また、第二試薬として、コレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼ(またはコレステロールデヒドロゲナーゼ)、パーオキシダーゼ、4-アミノアンチビリンおよびトリンダー試薬(またはNAD(P))を含む緩衝液を調製する(トリンダー試薬は第一試薬中に入れてもよい)。

体液検体を一定量第一試薬に添加し、例えば37℃で数分間加温してLDL、VLDLおよびCMを凝集させる。これに第二試薬を添加、攪拌して酵素反応させた後、コレステロールオキシダーゼにより過酸化水素が発生する場合には4-アミノアンチビリンおよびトリンダー試薬から過酸化水素とパーオキシダーゼによって生成する色素の極大波長における吸光度を測定し、コレステロールデヒドロゲナーゼを用いる場合にはNAD(P)Hの増加を300~500nm

好ましくは330~400nm、例えば340nmでの吸光度で測定する(ジアホラーゼ、テトラゾリウム塩を添加してホルマサン色素の発色に導き、ホルマサン色素を比色定量することも可能である)。HDLコレステロール量は、別途一定量のコレステロールを含む標準液で同じ操作を行い、比較計算する。なお、第一試薬と第二試薬とを最初からまとめ、これに体液検体を添加して例えば37℃で数分間加温し、LDL、VLDLおよびCMを凝集させてさらに酵素反応させることもできる。

【0007】リボ蛋白を凝集させる試薬には凝集剤および2価の金属塩が含まれる。凝集剤としては、ヘパリンまたはその塩、リソチングステン酸またはその塩、デキストラン硫酸またはその塩、ポリエチレンジコール、硫酸化シクロデキストリンまたはその塩、硫酸化オリゴ糖またはその塩、もしくはこれらの混合物などがあげられ、シクロデキストリンとしては、 α -シクロデキストリン、 β -シクロデキストリン、 γ -シクロデキストリンなどがあげられ、オリゴ糖としては、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトベントオース、マルトヘキサオース、マルトヘプタオースなどがあげられ、塩

50

としては、ナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩、アンモニウム塩、マグネシウム塩などがあげられる。2価の金属塩としては、マグネシウム塩、カルシウム塩、マンガン塩、ニッケル塩などがあげられる。

【0008】凝集剤としては、0.02~10 mMの分子量5000~20000のヘパリンまたはその塩、0.1~10 mMの分子量4000~8000のリソングステン酸またはその塩、0.01~5 mMの分子量10000~50000のデキストラン硫酸またはその塩、0.1~20 mMの分子量1000~10000のデキストラン硫酸またはその塩、0.3~100 mMの分子量4000~25000のポリエチレングリコール(PEG)、0.1~50 mMの分子量1000~3000の硫酸化シクロデキストリンまたはその塩、0.1~50 mMの分子量400~3000の硫酸化オリゴ糖またはその塩、もしくはそれらの混合物などが好ましく用いられる。さらに好ましくは、0.03~1 mMの分子量14000~16000のヘパリンまたはその塩、0.1~3 mMの分子量5000~7000のリソングステン酸またはその塩、0.01~5 mMの分子量15000~25000のデキストラン硫酸またはその塩、0.1~10 mMの分子量1000~5000のデキストラン硫酸またはその塩、1.0~50 mMの分子量5000~22000のPEG、0.1~10 mMの分子量1000~2000の硫酸化シクロデキストリンまたはその塩、0.1~10 mMの分子量400~2000の硫酸化オリゴ糖またはその塩、もしくはそれらの混合物などが用いられる。

【0009】2価の金属塩としては、0.1~50 mMのマグネシウム塩、カルシウム塩、マンガン塩、ニッケル塩などがあげられ、好ましくは、0.1~50 mMのマグネシウム塩が用いられる。

【0010】トリンダー試薬としては、N-エチル-N-(3-メチルフェニル)-N'-サクシニルエチレンジアミン(EMS E)、N-エチル-N-(3-メチルフェニル)-N'-アセチルエチレンジアミン、N,N-ジメチル-m-トルイジン、N,N-ジスルホプロピル-3,5-ジメトキシアニリン、N-エチル-N-スルホプロピル-m-アニシン、N-エチル-N-スルホプロピルアニリン、N-エチル-N-スルホプロピル-3,5-ジメトキシアニリン、N-エチル-N-スルホプロピル-3,5-ジメチルアニリン、N-エチル-N-スルホプロピル-m-トルイジン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-アニシン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)アニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリ*

*ン、N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメチルアニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-トルイジン、N-スルホプロピルアニリン、3-ヒドロキシ-2,4,6-トリヨード安息香酸、フェノールなどがあげられる。

【0011】酵素としては、通常市販されている、コレステロールエステルを加水分解する能力を有する微生物または動物由来のコレステロールエステラーゼやリボプロテインリバーゼ、コレステロールを酸化して過酸化水素を生成する微生物由来のコレステロールオキシダーゼ、微生物または動物由来のコレステロールデヒドログナーゼなどがあげられるが、これら酵素の特異性、安定性をさらにあげるためにポリエチレングリコールを主成分とする基、水溶性のオリゴ糖残基、スルホプロピル基などで上記の酵素を化学的に修飾したものも用いられる。また、遺伝子操作により得られる酵素も用いられる。

【0012】本発明の系は、通常のコレステロールを測定する系を含んでいるため、コレステロールオキシダーゼを活性化するためによく使用される界面活性剤あるいはコール酸類も使用可能であり、また、グロブリンなどを可溶化するための種々の塩類を使用することもできる。界面活性剤としては、ノニオン系、アニオン系、カチオン系の界面活性剤が0~1%の範囲で使用され、コール酸類としては、コール酸、デオキシコール酸、タウロコール酸、ケノデオキシコール酸などが0~5%の範囲で使用され、塩類としては、塩化ナトリウム、硫酸ナトリウム、塩化カリウム、硫酸カリウム、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウム、酢酸マグネシウム、塩化リチウム、硫酸リチウム、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、硝酸マグネシウム、硝酸カルシウムなどが0~100 mMの範囲で使用される。

【0013】緩衝剤としては、5~500 mMのトリス、グッドの緩衝剤などが好適に使用される。pHは5~9の範囲がよい。次に、実施例によって本発明の態様を説明する。

【0014】

【実施例】

実施例1

リソングステン酸-デキストラン硫酸-Mg沈殿法
〔デタミナーHDL(協和メデックス社製)で沈殿〕
(臨床化学、初版、荻三男著、医典社、110頁、1987年)、直接HDLコレステロールを測定する本法および特開昭63-126498に記載のコール酸を用いる方法(以下、A法という)を比較した。

【0015】

本法の組成

第一試薬 リソングステン酸

10

mg/ml (1.7 mM)

5

6

硫酸M g · 7水和物	7. 5
EMSE	0. 3
アジ化ナトリウム	0. 1
第二試薬 トリス	20 mM (pH 7)
4-アミノアンチピリン	0. 5 mg/ml
パーオキシダーゼ	30 u/ml
コレステロールエステラーゼ	1
コレステロールオキシダーゼ	1

本法では、検体 $50 \mu l$ を第一試薬 $2.25 ml$ に添加 * 値を比較することにより算出した。

し、 $37^\circ C$ で5分間インキュベーションし、この時点で 10 【0016】沈殿法では遠心分離後日立7250自動分析機を用いてデタミナー LTC（協和メデックス社製）で測定した。結果を第1表に示す。
 一旦 $555 nm$ の吸光度を測定した (E1)。次いで、
 第二試薬を $0.75 ml$ 添加して攪拌し、5分後の同波長における吸光度を測定した (E2)。HDLコレステロールの濃度は、コレステロール濃度 $200 mg/dl$
 の標準液を用いて同様の操作を行い、(E2-E1) の*

第1表

	沈殿法	A法	本法
人血清 1	24 mg/dl	58 mg/dl	28 mg/dl
人血清 2	38	79	39
人血清 3	56	82	57

【0018】本法は、現在HDLコレステロールの測定法として常用されているリンタングス滕酸-デキストラン硫酸-Mg沈殿法とよい相関を示した。

実施例2

第一試薬に用いる凝集剤および2価の金属塩を種々組み換える以外は実施例1の本法と同様の操作を行い、血清※

※検体30検体を日立7250自動分析機（検体 $4 \mu l$ 、第一試薬 $300 \mu l$ 、第二試薬 $100 \mu l$ の条件）でそれぞれ測定した。沈殿法との相関を相関係数 (R) でみた。

30 【0019】結果を第2表に示す。

第一試薬の組成

A.	リンタングス滕酸	1.0	mg/ml (1.7 mM)
	硫酸M g · 7水和物	7. 5	
	EMSE	0. 3	
B.	デキストラン硫酸		
	ナトリウム(MW=4000)	7. 5	mg/ml (1.9 mM)
	硫酸M g · 7水和物	1.0	
	EMSE	0. 3	
C.	ヘパリンナトリウム	1.0	mg/ml (0.7 mM)
	塩化Ca · 2水和物	1.0	
	EMSE	0. 3	
D.	リンタングス滕酸	1.0	mg/ml (1.7 mM)
	デキストラン硫酸		
	ナトリウム(MW=200000)	7. 5	(1.9 mM)
	硫酸M g · 7水和物	7. 5	
	EMSE	0. 3	
E.	リンタングス滕酸	1.0	mg/ml (1.7 mM)
	ヘパリンナトリウム	7. 5	(0.5 mM)
	硫酸M g · 7水和物	7. 5	

7

8

	EMSE	0. 3	
F.	リンタングステン酸	1 0	mg/ml (1. 7 mM)
	PEG 6000	7. 5	(1. 25 mM)
	硫酸Mg · 7水和物	7. 5	
	EMSE	0. 3	
G.	PEG 6000	5	mg/ml (0. 83 mM)
	硫酸Mg · 7水和物	5	
	EMSE	0. 3	
H.	硫酸化 α-シクロデキストリン	1	mg/ml (0. 8 mM)
	塩化Mg · 6水和物	5	
	N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-トルイジン	0. 6	
I.	硫酸化 マルトヘプタオース	2	mg/ml (0. 6 mM)
	塩化Mg · 6水和物	5	
	N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン	0. 7	

【0020】

【表2】

第2表

相関係数

A.	R=0. 902
B.	R=0. 859
C.	R=0. 889
D.	R=0. 923
E.	R=0. 910
F.	R=0. 909
G.	R=0. 835
H.	R=0. 911
I.	R=0. 877

* 【0021】実施例3

20 第一試薬に添加される2価の金属塩の種類を変え添加量を30mMとして実施例1の本法と同様の操作を行い、血清検体30検体を日立7250自動分析機(検体4μl、第一試薬300μl、第二試薬100μlの条件)でそれぞれ測定した。沈殿法との相関を相関係数(R)でみた。

【0022】結果を第3表に示す。

組成

第一試薬	リンタングステン酸 (2価金属塩)	1 0	mg/ml (1. 7 mM)
		3 0	mM)
	EMSE	0. 3	
	塩化ナトリウム	5	
	アジ化ナトリウム	0. 1	
第二試薬	トリス	2 0	mM (pH 7)
	4-アミノアンチビリン	0. 5	mg/ml
	コール酸ナトリウム	5	
	パーオキシダーゼ	3 0	u/ml
	コレステロールエステラーゼ	1	
	コレステロールオキシダーゼ	1	

【0023】

50 【表3】

第3表

2価の金属塩	相関係数
硫酸Mg	R=0.914
塩化Ca	R=0.835
塩化Mn	R=0.816
塩化Ni	R=0.798

【0024】実施例4

組成			
第一試薬	リンタンゲステン酸	10	mg/ml (1.7 mM)
	デキストラン硫酸		
	ナトリウム(MW=4000)	7.5	(1.9 mM)
	硫酸Mg・7水和物	7.5	
	EMSE	0.3	
	塩化ナトリウム	5	
	アジ化ナトリウム	0.1	
	アスコルビン酸		
	オキシダーゼ	1 u/ml	
第二試薬	トリス	20 mM (pH 7)	
	4-アミノアンチピリン	0.5 mg/ml	
	コール酸ナトリウム	5	
	パーAOキシダーゼ	30 u/ml	
	修飾コレステロール		
	エステラーゼ	1	
	修飾コレステロール		
	オキシダーゼ	1	

【0027】

【表4】

第4表

	沈殿法	本法	
人血清 1	2.4 mg/dl	2.6 mg/dl	
人血清 2	3.8	3.7	40
人血清 3	5.6	5.6	

※

組成 試薬	ビペラジン-1,4-ビス(2- エタンスルホニックアシド) [同仁化学研究所(株)] 3 mg/ml (9.9 mM) (pH 7)
EMSE	0.3
デキストラン硫酸	

11

ナトリウム	0. 7	mg/ml (1. 4 μM)
硫酸Mg・7水和物	7	
4-アミノアンチピリン	0. 5	
パーオキシダーゼ	5	u/ml
コレステロールエステラーゼ	1	
コレステロールオキシダーゼ	5	

【0029】 リンタングステン酸-デキストラン硫酸-Mg 沈殿法で HDL コレステロール濃度が 38. 9 mg/dl と測定された検体 50 μl を上記試薬 3 ml に添加し、20 秒後に一旦 555 nm の吸光度を測定した (E1)。次いで、37°C で 5 分間インキュベーションし、直ちに同波長における吸光度を測定した (E2)。HDL コレステロールの濃度は、コレステロール濃度 200 mg/dl の標準液を用いて同様の操作を行い、(E2-E1) の値を比較することにより算出した。その結果、HDL コレステロール濃度は 39. 1 mg/dl と算出され、沈殿法で得られた結果とほぼ一致した。

【0030】 実施例 6

(1) デキストランを修飾する試薬である T40, TC T-activated (ベーリンガー社製) でコレステロールエステラーゼおよびコレステロールオキシダーゼを化学修飾したもの、(2) ポリウレタンを修飾する試薬であるポリウレタン P4000-activated (ベーリンガー社製) でコレステロールエステラーゼおよびコレステロールオキシダーゼを化学修飾したもの、および (3) 1, 3-ブロパンサルトンでコレステロールエステラーゼおよびコレステロールオキシダーゼを化学修飾したものを用い、また、検体としてリンタングステン酸-デキストラン硫酸-Mg 沈殿法で HDL コレステロール濃度が 38. 9 mg/dl と測定された検

10 体 50 μl を用いて、実施例 4 と同様の操作を行った。その結果、HDL コレステロール濃度はそれぞれ (1)

39. 7 mg/dl、(2) 38. 2 mg/dl および (3) 39. 0 mg/dl と算出され、沈殿法で得られた結果とほぼ一致した。

【0031】 なお、化学修飾は、以下のようにして行った。

(1), (2) 20 mM リン酸緩衝液 (pH 8) に酵素 (10 mg/ml) を溶解させて 5°C に冷却後、これに 20 倍モルの T40, TCT-activated またはポリウレタン P4000-activated を添加して溶解させ、5°C で 4 時間反応させた。得られた化学修飾酵素は、精製分離せずそのまま酵素溶液として用いた。

20 【0032】 (3) 20 mM リン酸緩衝液 (pH 8) に酵素 (10 mg/ml) を溶解させ、これに 20 倍モルの 1, 3-ブロパンサルトンのジメチルホルムアミド溶液 (10 mg/ml) を添加し、37°C で 24 時間反応させた。得られた化学修飾酵素は、精製分離せずそのまま酵素溶液として用いた。

【0033】

【発明の効果】 本発明により、煩雑な分画分離操作の不要な簡便な HDL コレステロールの定量法が提供される。

フロントページの続き

(72) 発明者 上釜 兼人

熊本県熊本市長嶺町1716-80

(72) 発明者 大澤 進

千葉県四街道市みそら4-17-9

(56) 参考文献 特開 平6-242110 (J P, A)

特開 平2-210265 (J P, A)